

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/136508 A1

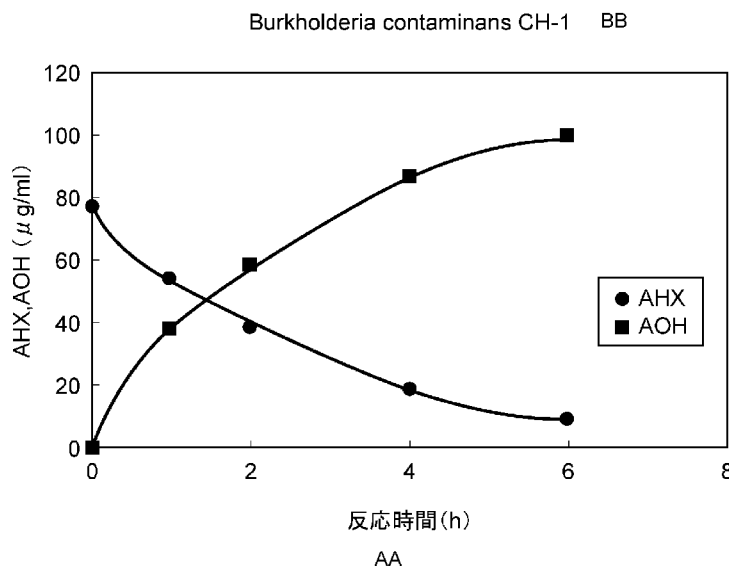
- (51) 国際特許分類:  
*C12P 17/18* (2006.01) *C12R 1/40* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01) *C12R 1/66* (2006.01)  
*C12R 1/07* (2006.01) *C12R 1/72* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01) *C12R 1/85* (2006.01)  
*C12R 1/38* (2006.01) *C12R 1/885* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054182
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 12 日(12.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-033001 2015 年 2 月 23 日(23.02.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人静岡大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: 徳山 真治(TOKUYAMA Shinji); 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学大学院農学研究科内 Shizuoka (JP). 崔 宰熏(CHOI Jae-Hoon); 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学大学院農学研究科内 Shizuoka (JP). 河岸 洋和(KAWAGISHI Hirokazu); 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学グリーン科学技術研究所内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番 1 号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 2-AZA-8-OXOHYPOXANTHINE

(54) 発明の名称: 2-アザ-8オキソヒポキサンチンの製造方法

[図1]



AA Reaction time (h)  
BB Burkholderia contaminans CH-1

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing 2-aza-8-oxohypoxanthine, comprising the steps of: reacting 2-azahypoxanthine with a microorganism to produce 2-aza-8-oxohypoxanthine; and isolating 2-aza-8-oxohypoxanthine from a reaction solution.

(57) 要約: 本発明は、2-アザ-8オキソヒポキサンチンの製造方法であって、2-アザヒポキサンチンと微生物とを反応させ、それにより2-アザ-8オキソヒポキサンチンを生成させる工程と、反応液から2-アザ-8オキソヒポキサンチンを単離する工程と、を含む、方法を提供する。



LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称： ２－アザ－８オキソヒポキサンチンの製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、２－アザ－８オキソヒポキサンチンの製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] ２－アザ－８オキソヒポキサンチン（以下、場合により「ＡＯＨ」と称する。）は、植物成長促進活性を示すことが知られている化合物である。特許文献１には、２－アザヒポキサンチン（以下、場合により「ＡＨＸ」と称する。）にキサンチンオキシダーゼ（以下、場合により「ＸＯＤ」と称する。）を作用させてＡＯＨを得る方法が開示されている。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0003] 特許文献１：国際公開第２０１２／１４７７５０号

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0004] 化学合成によってＡＯＨの大量生産を行う方法は確立されていない。また、ＡＨＸにＸＯＤを作用させてＡＯＨを得る方法は、生成効率が低く、また、ＸＯＤが非常に高価であるため、多量にＡＯＨの製造を行うには適していない。

[0005] 本発明は、ＡＯＨを製造することができる新規な方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、ＡＯＨの製造方法であって、ＡＨＸと微生物とを反応させ、それによりＡＯＨを生成させる工程と、反応液からＡＯＨを単離する工程と、を含む。

[0007] 上記方法において、微生物は、バークホリデリア属細菌、ブティアウクセラ属細菌、シュウドモナス属細菌、大腸菌、バチルス属細菌、サッカロマイ

セス属菌、クリベロマイセス属菌、キャンディダ属菌、チゾサッカロマイセス属菌、ピチア属菌、アスペルギルス属菌及びトリコデルマ属菌からなる群から選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。上記微生物は、バークホリデリア・コンタミナンス、バークホリデリア・セパシア、バークホリデリア・フンゴラム、ブティアウクセラ・ガビニアエ、ブティアウクセラ・アグレスチス、シュウドモナス・プチダ、シュウドモナス・シンキサンタ、シュウドモナス・バンコウベレンシス、シュウドモナス・ジェスセニイ及びシュウドモナス・プレコグロスシンダからなる群から選択される少なくとも1種であることがより好ましい。これらの微生物を用いることによって、より高効率でAOHを生成することができる。

### 発明の効果

[0008] 本発明により、AOHを製造することができる新規な方法を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0009] [図1] *Burkholderia contaminans* CH-1を用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図2] *Burkholderia cepacia*を用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図3] *Burkholderia fungorum*を用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図4] *Burkholderia contaminans* CH-1を用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図5] XODを用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図6] *Burkholderia contaminans* CH-1を用いた反応液中のAOH濃度を示すグラフである。

[図7] *Burkholderia contaminans* CH-1を用いた反応液中のAHX及びAOH濃度を示すグラフである。

[図8] *Pseudomonas synxantha* A13を用いた反応液

中のA H X及びA O H濃度を示すグラフである。

[図9] *Pseudomonas putida* A 8 2を用いた反応液中のA H X及びA O H濃度を示すグラフである。

[図10] *Buttiauxella gaviniae* A 1 1 1を用いた反応液中のA H X及びA O H濃度を示すグラフである。

[図11] *Pseudomonas vancouverensis* A 1 1 2を用いた反応液中のA H X及びA O H濃度を示すグラフである。

[図12] *Buttiauxella gaviniae* A 1 1 1を用いた反応液中のA H X残存率を示すグラフである。

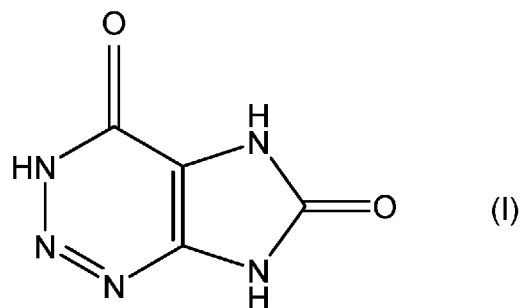
### 発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の好適な実施形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0011] 本実施形態に係るA O Hの製造方法は、A H Xと微生物とを反応させ、それによりA O Hを生成させる工程と、反応液からA O Hを単離する工程と、を含む。

[0012] 2-アザー-8オキソヒポキサンチン(A O H)は3 H-イミダゾ[4, 5-d][1, 2, 3]トリアジン-4, 6(5 H, 7 H)-ジオンとも表され、下記式( I )で表される化合物である。

[0013] [化1]

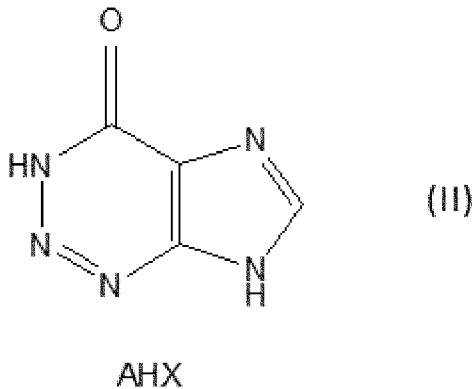


AOH

[0014] 2-アザヒポキサンチン(A H X)は、7 H-イミダゾ[4, 5-d][1, 2, 3]トリアジン-4(3 H)-オンとも表され、下記式( I I )で

表される化合物である。

[0015] [化2]



[0016] 本実施形態において用いられる微生物は、AHXからAOHを生成する能力を有しているものであればよい。本実施形態に係る製造方法によれば、XODを用いる場合と比べて生成物（AOH）による反応阻害が抑えられるため、反応液中のAHX濃度が高くても、効率的にAOHを製造することができる。また、高価なXODを用いる必要がなく、安価にAOHを製造することができる。

[0017] 微生物としては、例えば、細菌、真菌等が挙げられる。細菌としては、例えば、バークホリデリア属細菌、ブチアウクセラ属細菌、シュウドモナス属細菌、大腸菌、バチルス属細菌等を用いることができる。真菌としては、例えば、サッカロマイセス属菌、クリベロマイセス属菌、キャンディダ属菌、チゾサッカロマイセス属菌、ピチア属菌、アスペルギルス属菌、トリコデルマ属菌等を用いることができる。これらの微生物は1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。微生物は、バークホリデリア属細菌、ブチアウクセラ属細菌又はシュウドモナス属細菌であることが好ましく、ブチアウクセラ属細菌又はシュウドモナス属細菌であることがより好ましい。これらの微生物を用いると、より高効率でAOHを生成させることができる。

[0018] バークホリデリア属細菌としては、例えば、バークホリデリア・コンタミナンス（*Burkholderia contaminans*）、バークホ

リデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、バークホリデリア・フンゴルム (*Burkholderia fungorum*) 等が挙げられる。ブティアウクセラ属細菌としては、ブティアウクセラ・ガビニアエ (*Buttiauxella gaviniae*)、ブティアウクセラ・アグレスチス (*Buttiauxella agrestis*) 等が挙げられる。シュウドモナス属細菌としては、シュウドモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュウドモナス・シンキサンタ (*Pseudomonas synxantha*)、シュウドモナス・バンコウベレンシス (*Pseudomonas vancouverensis*)、シュウドモナス・ジェスセニイ (*Pseudomonas jessenii*)、シュウドモナス・プレコグロスシシダ (*Pseudomonas plecoglossicida*) 等が挙げられる。

[0019] 微生物は、これらの中でも、バークホリデリア・コンタミナンス、バークホリデリア・セパシア、バークホリデリア・フンゴルム、ブティアウクセラ・ガビニアエ、ブティアウクセラ・アグレスチス、シュウドモナス・プチダ、シュウドモナス・シンキサンタ、シュウドモナス・バンコウベレンシス又はシュウドモナス・ジェスセニイであることが好ましく、バークホリデリア・コンタミナンス、ブティアウクセラ・ガビニアエ、ブティアウクセラ・アグレスチス、シュウドモナス・プチダ、シュウドモナス・シンキサンタ、シュウドモナス・バンコウベレンシス又はシュウドモナス・ジェスセニイであることがより好ましく、ブティアウクセラ・ガビニアエ、シュウドモナス・プチダ、シュウドモナス・シンキサンタ又はシュウドモナス・バンコウベレンシスであることが更に好ましく、ブティアウクセラ・ガビニアエ又はシュウドモナス・プチダであることが特に好ましい。上記微生物を用いると、より高効率でAHXからAOHを生成することができる。

[0020] AHXと微生物とを反応させ、それによりAOHを生成させる工程は、例えば、予め培養して用意した微生物を含む懸濁液とAHXを含む溶液とを混合することにより行うことができる。AHXと微生物とを反応させ、それに

よりA O Hを生成させる工程は、例えば、A H Xと微生物とを接触させ、それによりA O Hを生成させる工程、または、A H Xと微生物とを接触させ、それによりA H XをA O Hに変換する工程ということもできる。

[0021] 微生物の培養は、微生物の一般的な培養条件で行うことができる。培養は、例えば、6～24時間、pH 6～8、温度25～42℃の条件で行うことができる。培養は例えば通気振とうして行うことができる。微生物を培養するための培地としては、微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩類、その他ビタミン、ミネラル等の栄養成分を含む各種の培地を使用することができる。バークホリデリア属菌等の細菌に適した培地としては、例えば、T S B培地、Y M培地等が挙げられる。微生物は、対数増殖期後期のものを用いることが好ましい。培養した微生物は、培地から遠心分離等を行うことにより集菌して、A H Xとの反応に用いることができる。微生物は集菌後に洗浄したものをA H Xとの反応に用いてもよい。

[0022] A H Xと微生物との反応を行うための溶媒は緩衝液であることが好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）等を用いることができる。

[0023] 反応液中のA H X濃度は任意に設定することができる。本実施形態における製造方法では、X O Dを用いてA H XからA O Hの生成を行う場合と異なり、反応液中のA H X濃度が高くても、A O Hの生成効率を長時間高く保つことができる。

[0024] 反応により生成したA O Hは、例えば、反応液を遠心分離して菌体を分離し、上澄みを回収して濃縮することによって回収することができる。回収した上澄みには加熱処理等を行ってもよい。回収したA O Hは更に精製、結晶化等を行ってもよい。

## 実施例

[0025] 以下、実施例により本発明の実施形態を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0026] （試験例1：A O Hの生成活性評価）

下記の微生物を用いて、A O H生成活性を調べた。

*Burkholderia contaminans* CH-1

*Burkholderia caryophylli* NBRC 13591

*Burkholderia cepacia* NBRC 14595

*Burkholderia caledonica* NBRC 102488

*Burkholderia fungorum* NBRC 102489

*Burkholderia ferrariae* NBRC 106233

*Burkholderia ginsengisoli* NBRC 100965

*Burkholderia mimosarum* NBRC 106338

上記微生物の内、*Burkholderia contaminans* CH-1（以下、「CH-1株」ともいう。）は、採取した空中落下菌から分離したものであり、16S rDNA系統解析によって*Burkholderia contaminans*の標準株（strain J2956）との類似性が100%であったことから、当該種であることが確認された。その他の微生物は、いずれもNBRC（独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）より分譲された。

[0027] 培地は表1に示す組成のものを用いた。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）としては表2に示す組成の10×PBS溶液を蒸留水で10倍希釈して使用した。

[0028] [表1]

| TSB                             | (g/L) |
|---------------------------------|-------|
| ポリペプトン                          | 17    |
| ソイペプトン                          | 3     |
| NaCl                            | 5     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2.5   |
| グルコース                           | 2.5   |
| pH 7.3                          |       |

## [0029] [表2]

| 10×PBS                                               | (g/L) |
|------------------------------------------------------|-------|
| NaCl                                                 | 80    |
| KCl                                                  | 2     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 36.3  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 2.4   |
| pH 7.4                                               |       |

[0030] 試験管に分注した5mlのTSB培地に上記各菌株を1白金耳植菌し、30℃、180rpmで振とう培養し、これを前培養液とした。100mlのTSB培地を分注した500ml容三角フラスコに、前培養液を1%植菌し、30℃、6時間、180rpmで培養した。得られた培養液1mlについて11000rpmで5分間遠心分離を行って集菌した。集めた菌体にPBS 1mlを加え、11000rpmで5分間遠心分離を行って洗浄した。

[0031] 洗浄した菌体の一定量をPBS 900μlに懸濁し、懸濁液に0.7mg/mlのAHXのPBS溶液を100μl加え、AHX濃度70μg/mlの反応液を作製した。反応液を丸底スピッツに移し、30℃で24時間反応させた。所定時間経過後、反応液を遠心分離して菌体を分離し、上澄みを回収して98℃で5分間加熱処理した。反応液上澄み中のAHX及びAOH濃度をHPLCで分析した。HPLCの分析条件は、カラム：Develosil C30-UG-5（野村化学株式会社）、移動相：水+0.02% TFA、温度：室温、流速：0.8ml/min、波長：254nm、注入：20μlとした。AHX及びAOHの保持時間はそれぞれ25.2分、26.6分であった。結果を表3に示す。なお、本実施例のHPLCの分析条件では、不純物との分離が不十分である可能性があり、そのため、AOH濃度は見かけ上実際より高く測定されている可能性がある。

[0032]

[表3]

| 菌株                                          | 濃度( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |
|---------------------------------------------|------------------------|-------|
|                                             | AHX                    | AOH   |
| <i>Burkholderia contaminans</i> CH-1        | 0                      | 122   |
| <i>Burkholderia caryophylli</i> NBRC 13591  | 78.4                   | 3.51  |
| <i>Burkholderia cepacia</i> NBRC 14595      | 0                      | 119   |
| <i>Burkholderia caledonica</i> NBRC 102488  | 72.0                   | 8.09  |
| <i>Burkholderia fungorum</i> NBRC 102489    | 0                      | 123   |
| <i>Burkholderia ferrariae</i> NBRC 106233   | 46.3                   | 49.6  |
| <i>Burkholderia ginsengisoli</i> NBRC100965 | 80.1                   | 0.666 |
| <i>Burkholderia mimosarum</i> NBRC 106338   | 77.0                   | 5.57  |

[0033] 用いたいずれの細菌においても、AHXを基質としてAOHを生成する能力があることが確認された。中でもCH-1株、*Burkholderia cepacia*及び*Burkholderia fungorum*は、培地中のAHXを全てAOHに変換しており、100%の変換効率を有していた。

[0034] (試験例2：AOH生成活性の比較)

CH-1株、*Burkholderia cepacia*及び*Burkholderia fungorum*の3種を用いて、反応開始6時間までのAOH生成活性を調べた。反応条件は、反応時間を所定時間とした以外は、上記試験例1と同様とした。所定時間に反応液中のAHX及びAOH濃度を試験例1と同様にHPLCで分析した。結果を図1(CH-1株)、図2(*Burkholderia cepacia*)、図3(*Burkholderia fungorum*)に示す。上記3種の中ではCH-1株のAOH生成活性が最も高かった。

[0035] (試験例3：生成物による反応阻害の検討)

CH-1株を用いて、反応液中のAHX初期濃度を2mg/mlとし、菌体濃度を試験例1の3倍量とした他は試験例1と同様の条件で96時間の反応を行った。反応中、所定の時間に反応液中のAHX濃度及びAOH濃度を試験例1と同様にHPLCにより測定した。結果を図4に示す。また、AH

Xの濃度を同じく2 mg / mlとし、キサンチンオキシダーゼ（バターミルク由来、オリエンタル酵母社）0.5 Uを用いて30℃でAOHの生成を行い、同様に反応液中のAHX濃度及びAOH濃度の測定を行った。結果を図5に示す。

[0036] キサンチンオキシダーゼを用いた反応では、一定時間経過後にAHX濃度が一定量を保ったまま変化しなくなり、生成されたAOHによる反応阻害が起きていることが示唆された（図5）。一方、CH-1株を用いた反応では、反応によって反応液中のAHX濃度が0 mg / mlとなり、使用した全てのAHXがAOHに変換されたことが示された（図4）。

[0037] （試験例4：AOH分解反応評価）

CH-1株を用いて、反応液中の菌体濃度を試験例1の2倍量とし、基質をAHXの代わりにAOHを用いた以外は試験例1と同様の方法で反応を行った。反応液中のAOHの濃度を試験例1と同様にHPLCにより測定した。結果を図6に示す。AOHをCH-1株とともに懸濁させても、AOHの濃度は減少しなかった。CH-1株のAOH分解活性は極めて弱いことが確認された。

[0038] （試験例5：AOH収率評価）

CH-1株を用いて、反応液中の菌体濃度を試験例1の3倍量とし、AHXの初期濃度及び反応温度を表4に示す条件とした以外は試験例1と同様の反応条件により、8時間の反応を行った。反応後、反応液を遠心分離して菌体を分離し、上澄みを得た。上澄みを98℃で5分間加熱処理し、ロータリーエバポレーターで1/7の容積まで濃縮し、4℃で3日間放置して沈殿を形成させた。その後、沈殿を含む液をろ紙でろ過し、得られた生成物を乾燥させてAOHを回収し、使用したAHX量に基づくAOHの収率を算出した。初期のAHX使用量及び30時間培養後のAOH収率を表4に示す。

[0039]

[表4]

| AHX濃度<br>(%) | 反応温度 | 初期 AHX<br>(mg) | AOH<br>(mg) | 収率(質量%) | モル収率(%) |
|--------------|------|----------------|-------------|---------|---------|
| 3            | 30℃  | 600            | 515         | 85.8    | 78.0    |
| 4            | 40℃  | 1600           | 1606        | 100.4   | 89.9    |

[0040] CH-1株等の微生物を用いる方法（微生物法）により、高効率でAOHの生成を行うことができた。また、XODを用いてAOH生成反応を行う方法（XOD法）と比較すると、微生物法では、生成されたAOHによる反応阻害が生じにくいことから、培地中の基質濃度を約60倍に高めることが可能であった。結果、AOHの生成量当たりで比較すると、微生物法によって、使用する反応液量をXOD法の場合の約45分の1に減らすことができ、それに伴い生成後の濃縮操作を約14分の1に短縮することができた。また、微生物法では、XOD法と比較して著しく低いコストでAOH生成を行うことができた。

[0041] （試験例6：各種微生物のAOH生成活性）

下記表5に示す各種微生物及びCH-1株を用いてAOH生成活性を調べた。各種微生物の種類に応じた方法で予め培養しておいた菌株を集菌し、一定量の菌体をPBSに懸濁し、AHX濃度が70 $\mu$ g/mlとなるようAHX溶液を添加し、40℃で24時間反応させた。所定時間経過後、反応液を遠心分離して菌体を分離し、上澄みを回収して98℃で5分間加熱処理した。反応液上澄み中のAHX及びAOH濃度を試験例1と同様の方法で測定した。結果を表5に示す。いずれの微生物もAHXからAOHを生成する活性を有することが確認された。

[0042]

[表5]

| 菌 株   | AIX                                                     |         | AOII       |
|-------|---------------------------------------------------------|---------|------------|
|       | 濃度 (μg/ml)                                              | 残存率 (%) | 濃度 (μg/ml) |
| Cont. | 77.5                                                    | 100     | 0          |
| CH-1  | 0                                                       | 0       | 105.7      |
| 細菌    | <i>Escherichia coli</i> JM 109                          | 68.2    | 88.0       |
|       | <i>Bacillus subtilis</i> NBRC 13719                     | 63.9    | 82.4       |
| 酵母    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC2377                | 43.7    | 56.4       |
|       | <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777                | 50.5    | 65.2       |
|       | <i>Candida albicans</i> NBRC1060                        | 44.2    | 57.0       |
|       | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> NBRC 1628              | 51.0    | 65.8       |
|       | <i>Pichia acaciae</i> NBRC1681                          | 51.0    | 65.8       |
|       | <i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i> NBRC 30113 | 48.4    | 62.5       |
| カビ    | <i>Aspergillus niger</i> NBRC 1221                      | 43.2    | 55.7       |
|       | <i>Tricoderma reesei</i> NBRC 31326                     | 61.5    | 79.4       |

## [0043] (試験例 7 : A O H 生成微生物の探索)

森林土壌を採取し、葉さじ一すくい分を 3 m l の生理食塩水に懸濁した。懸濁液を静置し、上清を希釈し、培地に塗抹した。培地としては、表 6、7 に示す組成の T S B 培地又は Y M 培地を 5 倍希釈したものを用いた。培地上に現れたコロニーを T S A 培地にストリークし、各菌株を得た。

## [0044] [表6]

| TSB                             | ( g/L ) |
|---------------------------------|---------|
| ポリペプトン                          | 3.4     |
| ソイペプトン                          | 0.6     |
| NaCl                            | 1       |
| グルコース                           | 0.5     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.5     |
| pH 7.3                          |         |

## [0045]

[表7]

| YM     | (g/L) |
|--------|-------|
| グルコース  | 4     |
| 麦芽抽出物  | 0.6   |
| ポリペプトン | 2     |
| 酵母抽出物  | 1     |
| pH 5.6 |       |

[0046] 試験管に分注した5 mLのTSB培地に、上記各菌株を植菌し、30℃、180 rpmで振とう培養し、これを前培養液とした。前培養液をTSB培地に1%植菌し、30℃、8時間、180 rpmで培養した。得られた培養液1 mLについて遠心分離を行って集菌した。

[0047] 集めた菌体をPBSで洗浄した後、一定量の菌体をPBS 900 mLに懸濁した、懸濁液に0.7 mg/mLのAHXのPBS溶液を100  $\mu$ L加え、AHX濃度70  $\mu$ g/mLの反応液を作製した。反応液を丸底スピッツに移し、30℃で5時間反応させた。所定時間経過後、反応液を遠心分離して菌体を分離し、上澄みを回収して98℃で5分間処理した。反応液上澄み中のAHX濃度を試験例1と同様の方法によりHPLCで分析し、AHX残存率を算出した。結果を表8に示す。森林土壌から分離された192株の内、少なくともCH-1株と同程度以上のAOH生成活性を示す株が11株得られた。

[0048] [表8]

| AHX残存率 | 菌株数 |
|--------|-----|
| ++++   | 11  |
| +++    | 8   |
| ++     | 24  |
| +      | 149 |

+:100~66%、++:65~31%、+++:30~1%、++++:0%

[0049] AHX残存率が低い11株の内、10株について16S rDNA系統解析を行った。解析により、それぞれの菌株は表9に示す標準株と同種であることが確認された。

## [0050] [表9]

|    | 菌株No. | 標準株                                            | 標準株との類似性 (%)       |
|----|-------|------------------------------------------------|--------------------|
| 1  | A4    | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164           | 1407/1428 ( 98.5 ) |
| 2  | A13   | <i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC 3913         | 1420/1435 ( 99.0 ) |
| 3  | A16   | <i>Buttiauxella agrestis</i> DSM 4586          | 1429/1432 ( 99.8 ) |
| 4  | A27   | <i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274         | 1409/1429 ( 98.6 ) |
| 5  | A82   | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164           | 1398/1420 ( 98.5 ) |
| 6  | A111  | <i>Buttiauxella gaviniae</i> DSM 9393          | 1425/1429 ( 99.7 ) |
| 7  | A112  | <i>Pseudomonas vancouverensis</i> ATCC 700688  | 1430/1433 ( 99.8 ) |
| 8  | A145  | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 | 1421/1427 ( 99.6 ) |
| 9  | A157  | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 | 1422/1427 ( 99.6 ) |
| 10 | A169  | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 | 1422/1428 ( 99.6 ) |

## [0051] (試験例8)

上記10菌株及びCH-1株を用いて、反応時間を2.5時間とした他は試験例7と同様の条件でAHXとの反応を行った。反応液上澄み中のAHX濃度を試験例1と同様の方法によりHPLCで分析した。結果を表10に示す。いずれの菌株もCH-1株よりもAOH生成活性が高かった。

## [0052] [表10]

|    | 菌株No. | AHX                      |           |
|----|-------|--------------------------|-----------|
|    |       | 実測値 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 残存率 ( % ) |
|    | Cont. | 69                       | 100       |
|    | CH-1  | 32                       | 47        |
| 1  | A 4   | 0                        | 0         |
| 2  | A 13  | 0                        | 0         |
| 3  | A 16  | 0                        | 0         |
| 4  | A 27  | 0.31                     | 0.45      |
| 5  | A 82  | 0                        | 0         |
| 6  | A 111 | 0                        | 0         |
| 7  | A 112 | 0                        | 0         |
| 8  | A 145 | 13                       | 19        |
| 9  | A 157 | 10                       | 15        |
| 10 | A 169 | 13                       | 20        |

## [0053] (試験例9)

試験例 8 で用いた菌株の内、A O H 生成活性の高かった 7 株について、反応時間を 0.5 時間又は 1 時間とした他は試験例 7 と同様の条件で A H X との反応を行った。反応液上澄み中の A H X 濃度を試験例 1 と同様の方法により H P L C で分析した。結果を表 1 1 に示す。

[0054] [表11]

| 菌株      | AHX                      |       |           |       |
|---------|--------------------------|-------|-----------|-------|
|         | 実測値 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       | 残存率 ( % ) |       |
|         | 0.5 h                    | 1.0 h | 0.5 h     | 1.0 h |
| Cont.   | 72                       | 72    | 100       | 100   |
| CH-1    | 55                       | 44    | 77        | 61    |
| 1 A 4   | 26                       | 6.5   | 37        | 9.1   |
| 2 A 13  | 2.2                      | 0     | 3.1       | 0     |
| 3 A 16  | 21                       | 5.8   | 29        | 8.1   |
| 4 A 27  | 9.5                      | 0.95  | 13        | 1.3   |
| 5 A 82  | 2.9                      | 0     | 4.0       | 0     |
| 6 A 111 | 0.52                     | 0     | 0.72      | 0     |
| 7 A 112 | 4.3                      | 0     | 6.0       | 0     |

[0055] (試験例 1 0)

試験例 9 で用いた菌株の内、さらに A O H 生成活性の高かった 4 菌株について、反応液中の A H X 濃度を  $2 \text{ mg/ml}$  とし、反応時間を 1 時間、2 時間又は 4 時間とした他は、試験例 7 と同様の条件で A H X との反応を行った。試験例 1 と同様の方法により H P L C で反応液中の A H X 及び A O H の濃度を測定した。結果を表 1 2 及び図 7、8、9、1 0、1 1 に示す。

[0056]

[表12]

| No. | 菌株    | AHX           |      |       |           |     |     |
|-----|-------|---------------|------|-------|-----------|-----|-----|
|     |       | 実測値 ( mg/ml ) |      |       | 残存率 ( % ) |     |     |
|     |       | 1 h           | 2 h  | 4 h   | 1 h       | 2 h | 4 h |
|     | Cont. | 2.0           | 2.0  | 2.0   | 100       | 100 | 100 |
|     | CH-1  | 1.9           | 1.9  | 1.7   | 94        | 94  | 87  |
| 2   | A 13  | 1.5           | 1.1  | 0.074 | 77        | 57  | 3.7 |
| 5   | A 82  | 1.3           | 0.65 | 0     | 66        | 33  | 0   |
| 6   | A 111 | 1.3           | 0.60 | 0     | 67        | 30  | 0   |
| 7   | A 112 | 1.5           | 1.2  | 0.085 | 78        | 60  | 4.3 |

## [0057] (試験例 1 1 )

A 1 1 1 株について、以下のとおり反応液容量を大きくしてA H Xとの反応実験を行った。表 1 3 に示すとおり、反応液量を 3 . 2 l、3 . 4 l 又は 6 . 0 l とし、反応液中のA H X濃度を 4 g / l 又は 5 g / l、反応時間を 2 4 時間とした他は、試験例 7 と同様の条件でA 1 1 1 株とA H Xとの反応を行った。反応後、得られたA O Hを結晶化して回収し、定量した。初期のA H X使用量及び回収されたA O H量に基づいて、A O H収率を算出した。結果を表 1 3 に示す。また、表 1 3 中のN o . 3 について、所定時間に反応液中のA H X濃度を測定し、A H X残存率を算出した。結果を図 1 2 に示す。

## [0058] [表13]

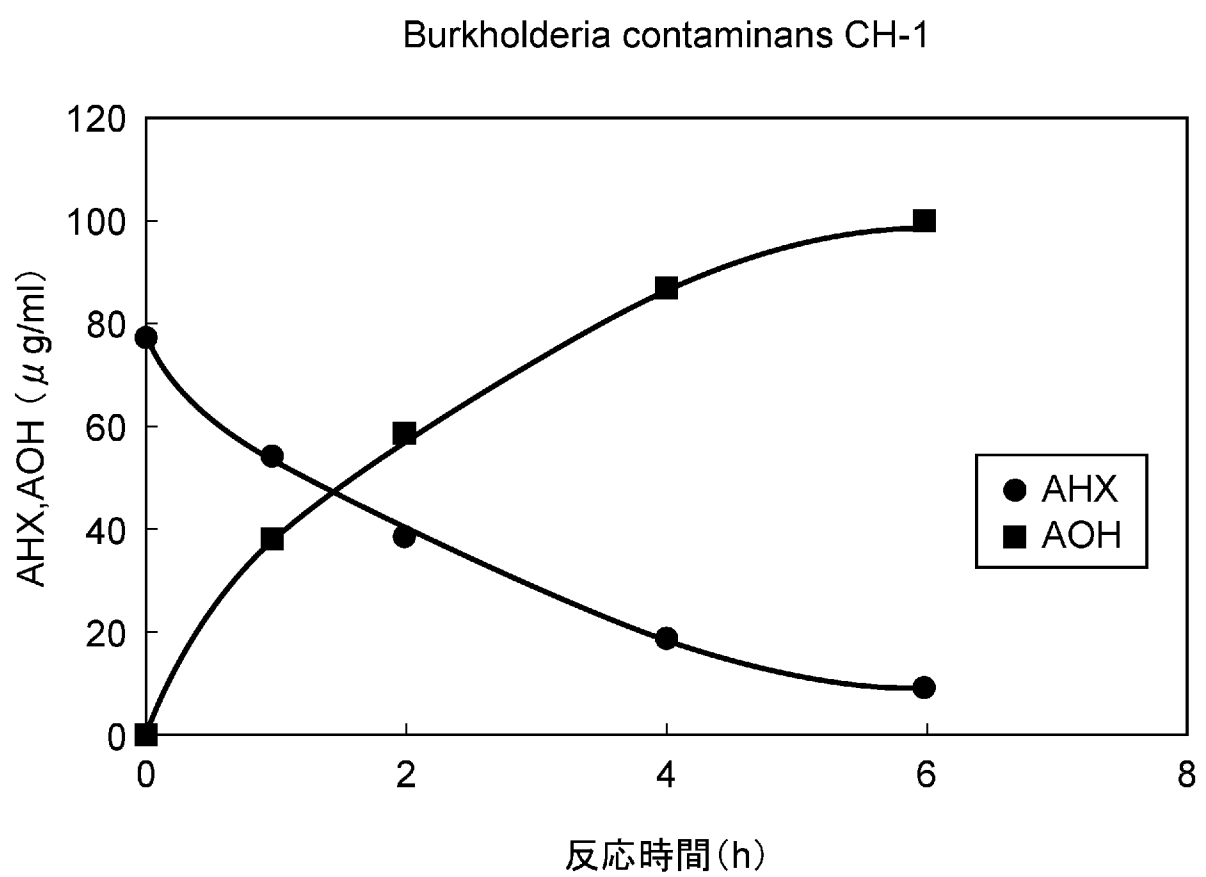
| No. | 反応液<br>容量(L) | 初期AHX<br>濃度(g/L) | 初期AHX<br>(g) | AOH<br>(g) | 収率<br>(質量%) |
|-----|--------------|------------------|--------------|------------|-------------|
| 1   | 3.4          | 4                | 13.5         | 12.3       | 81.6        |
| 2   | 3.2          | 5                | 16.0         | 16.0       | 89.5        |
| 3   | 6.0          | 5                | 30.0         | 31.1       | 92.8        |

[0059] 反応液容量が大きい場合にも、微生物法により高効率でA O Hを生成させることができた。

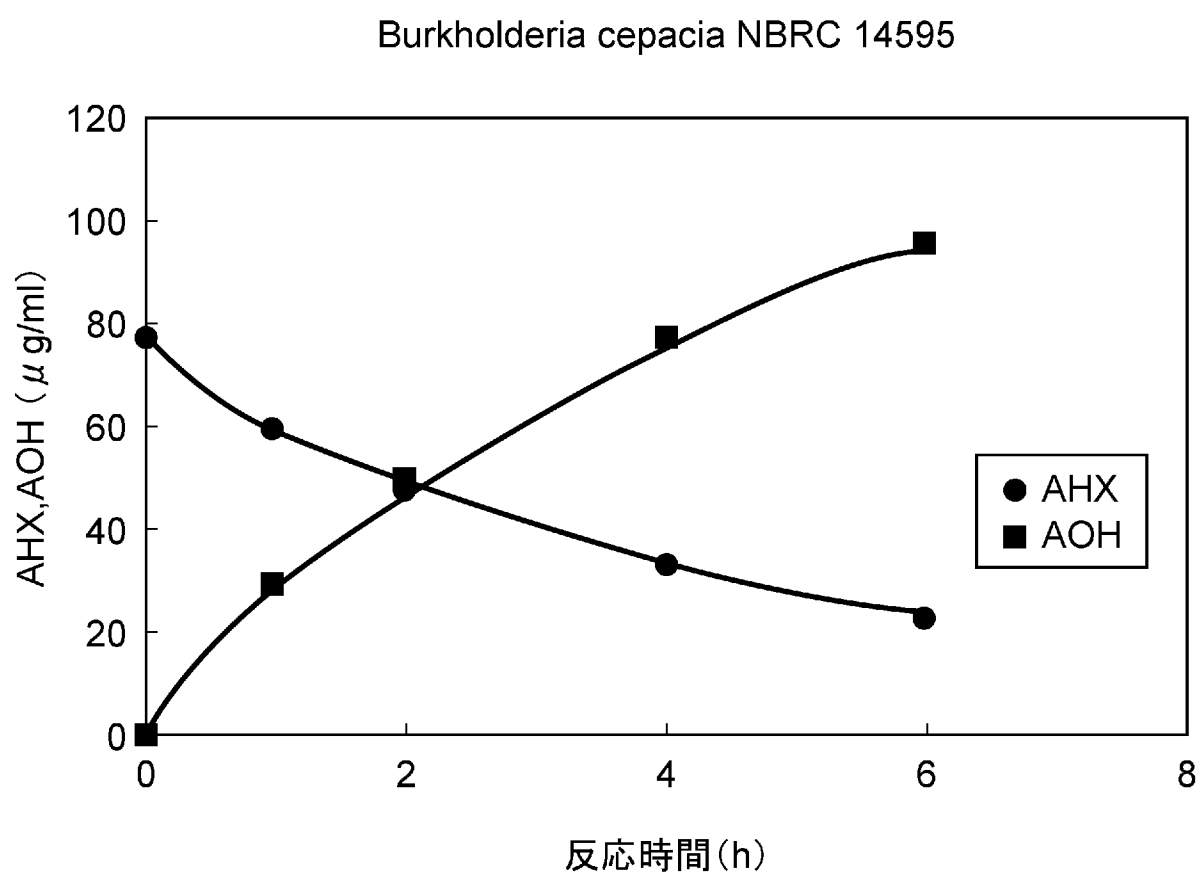
## 請求の範囲

- [請求項1]           2-アザ-8オキソヒポキサンチンの製造方法であって、  
                  2-アザヒポキサンチンと微生物とを反応させ、それにより2-ア  
                  ザ-8オキソヒポキサンチンを生成させる工程と、  
                  反応液から2-アザ-8オキソヒポキサンチンを単離する工程と、  
                  を含む、方法。
- [請求項2]           微生物が、バークホリデリア属細菌、ブチアウクセラ属細菌、シ  
                  ユウドモナス属細菌、大腸菌、バチルス属細菌、サッカロマイセス属  
                  菌、クリベロマイセス属菌、キャンディダ属菌、チゾサッカロマイセ  
                  ス属菌、ピチア属菌、アスペルギルス属菌及びトリコデルマ属菌から  
                  なる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3]           微生物が、バークホリデリア・コンタミナンス、バークホリデリア  
                  ・セパシア、バークホリデリア・フンゴルム、ブチアウクセラ・ガ  
                  ビニアエ、ブチアウクセラ・アグレスチス、シュウドモナス・プチ  
                  ダ、シュウドモナス・シンキサンタ、シュウドモナス・バンコウベレ  
                  ンシス、シュウドモナス・ジェスセニィ及びシュウドモナス・プレコ  
                  グロスシンダからなる群から選択される少なくとも1種である、請求  
                  項1に記載の方法。

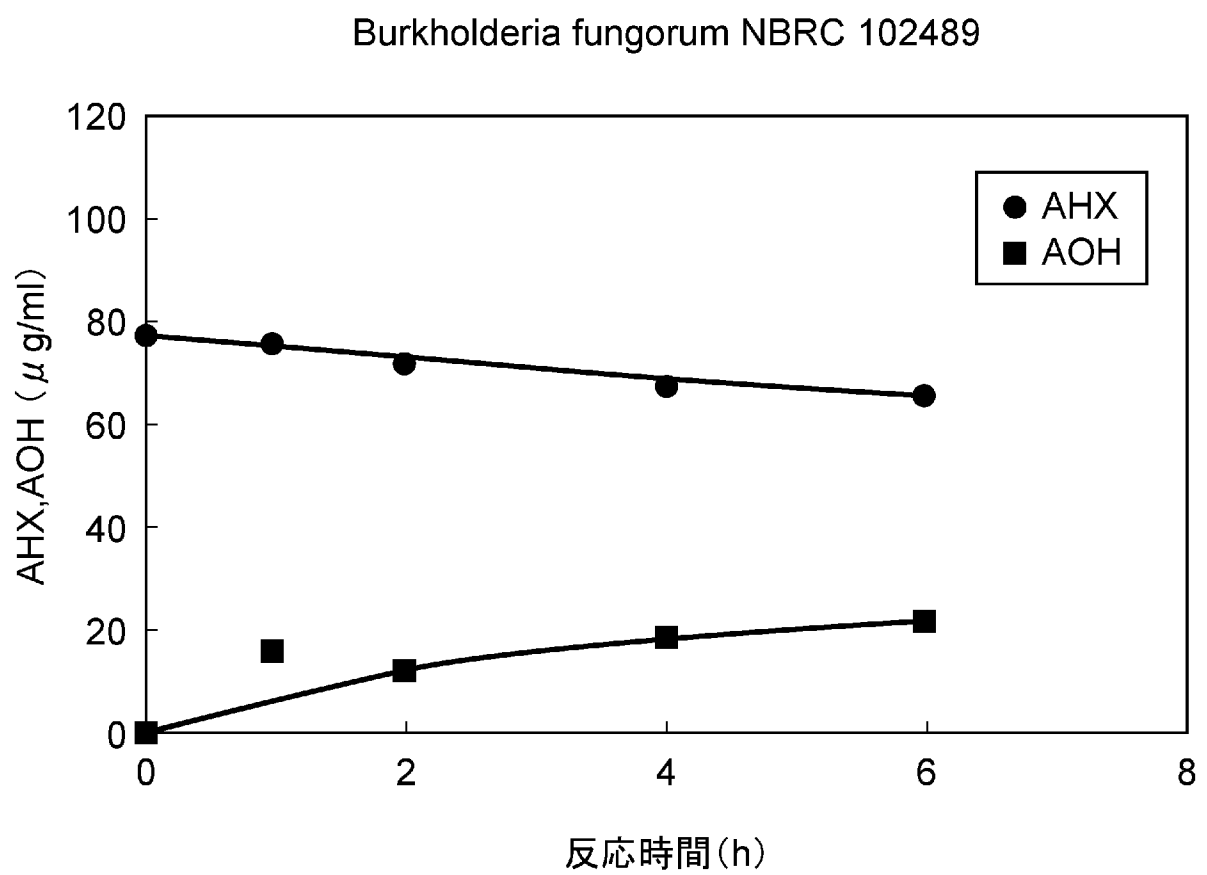
[図1]



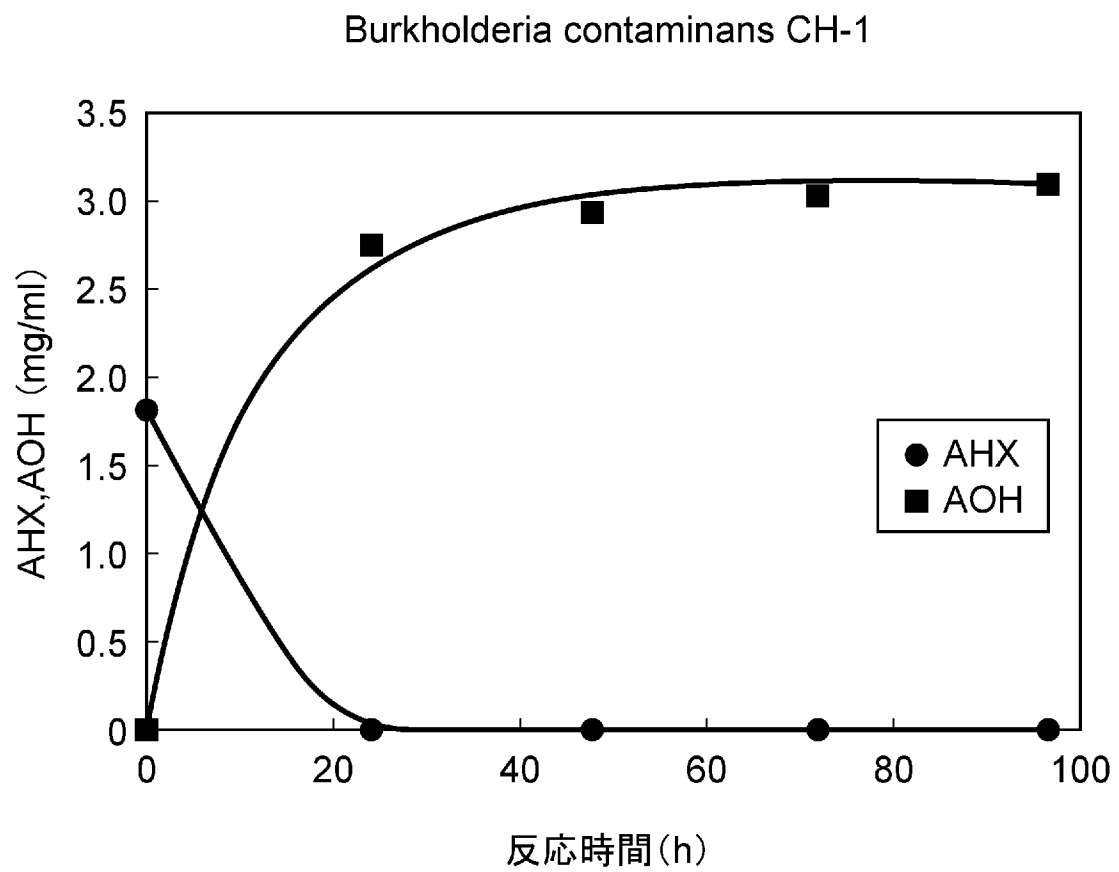
[図2]



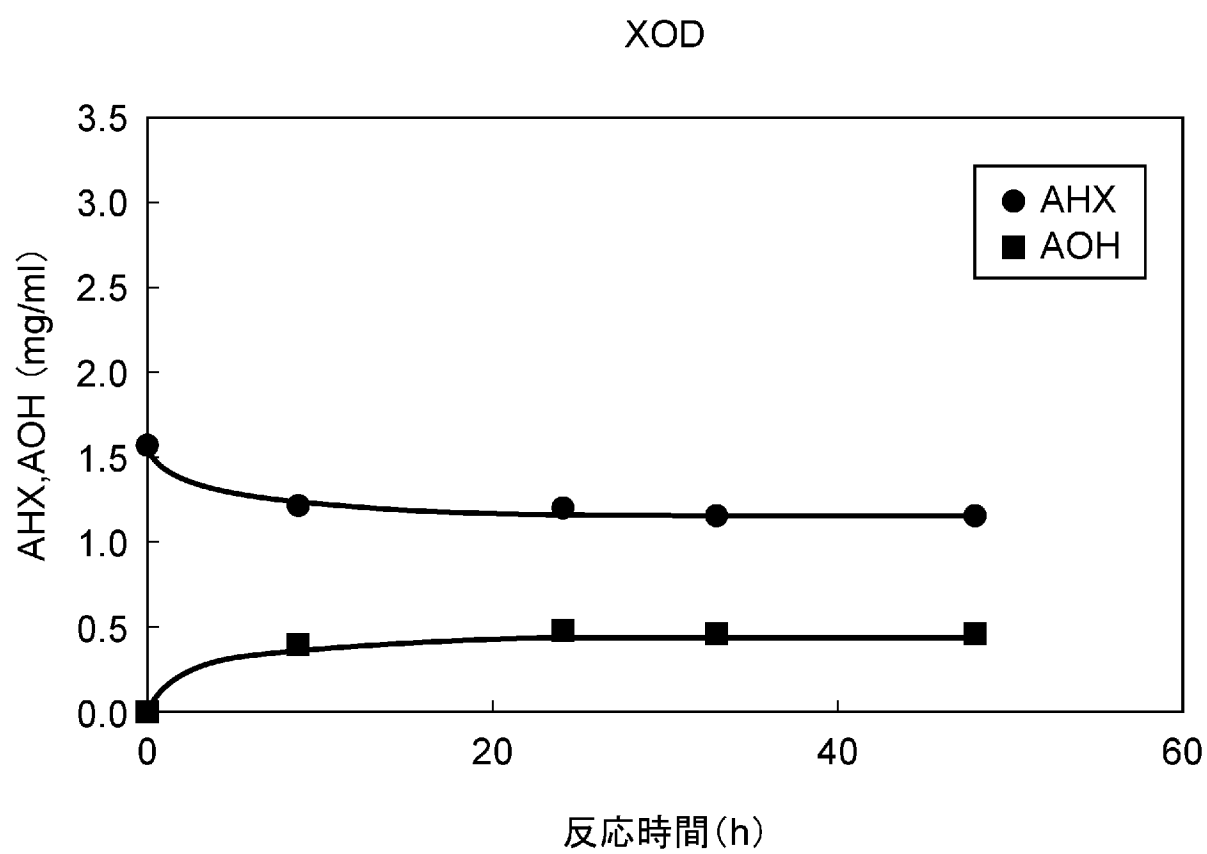
[図3]



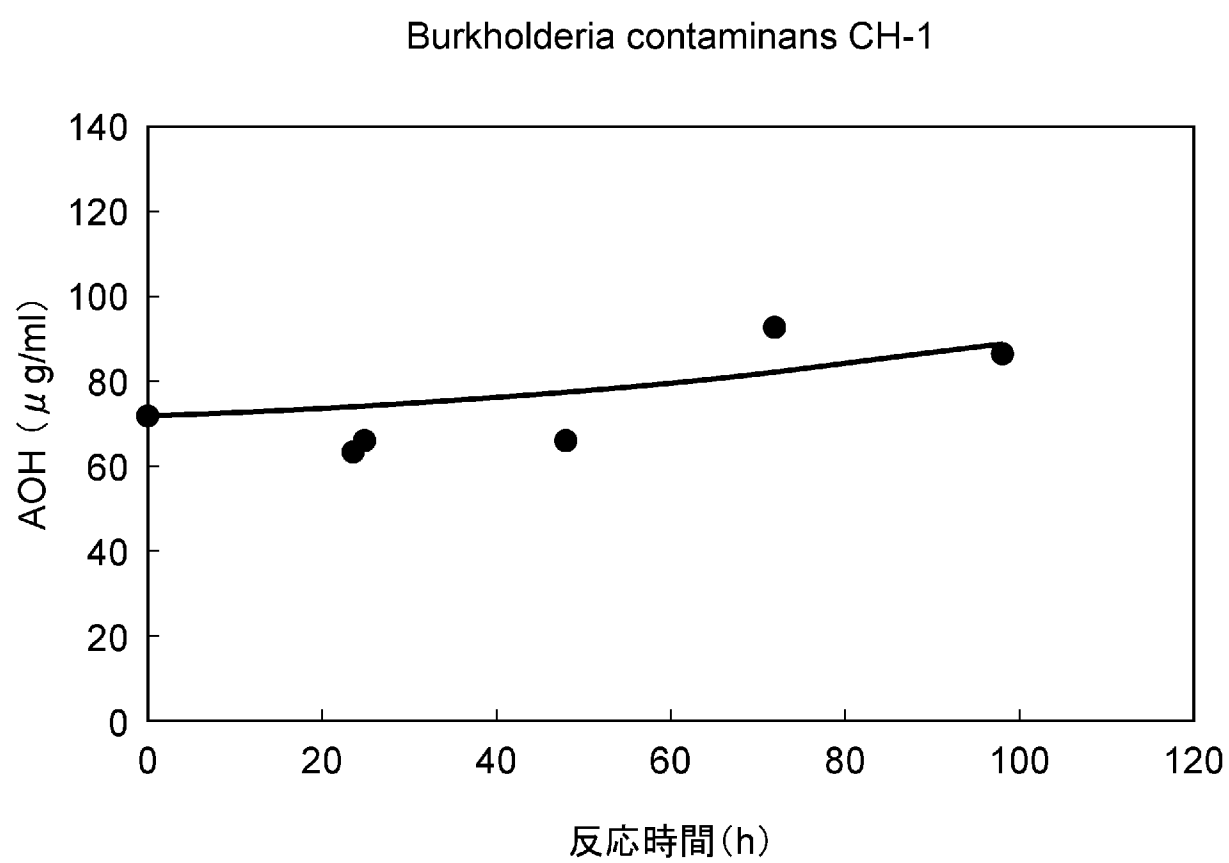
[図4]



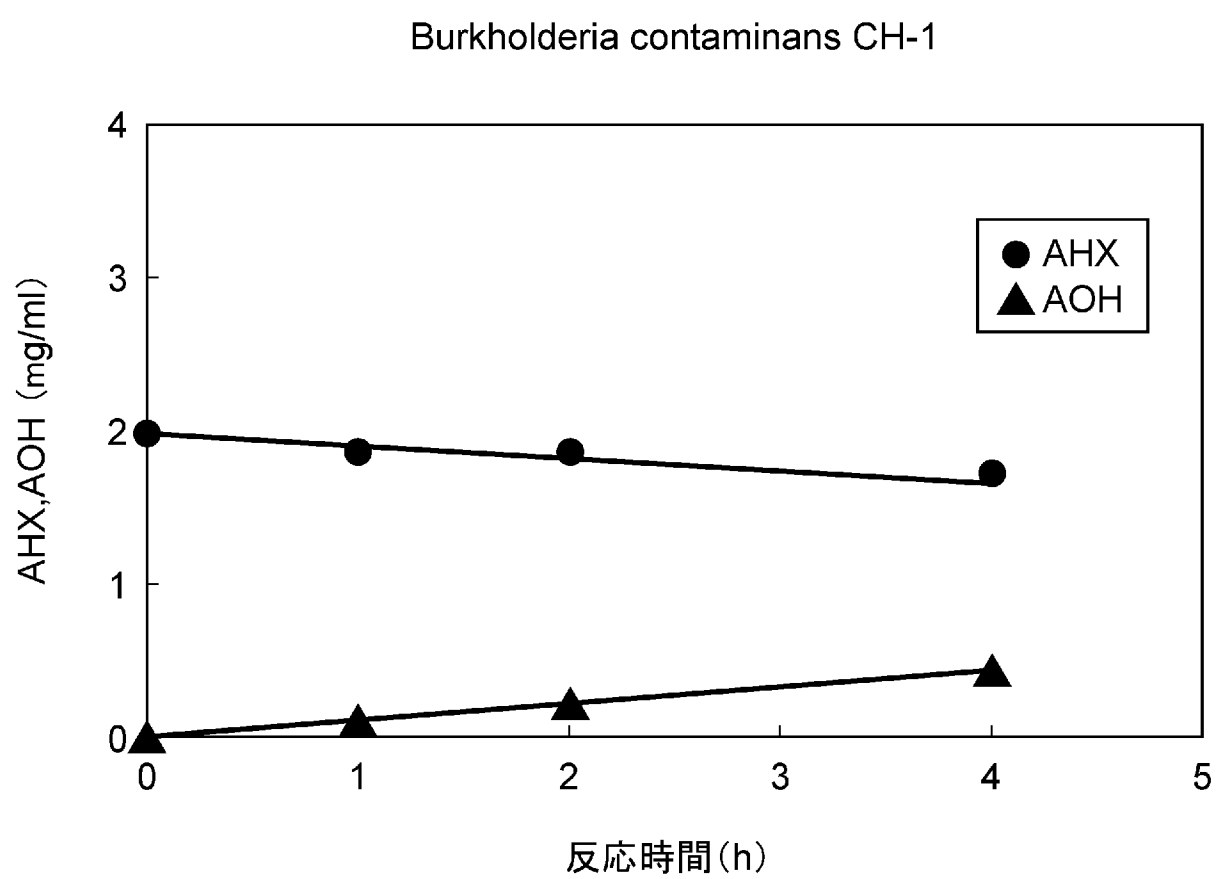
[図5]



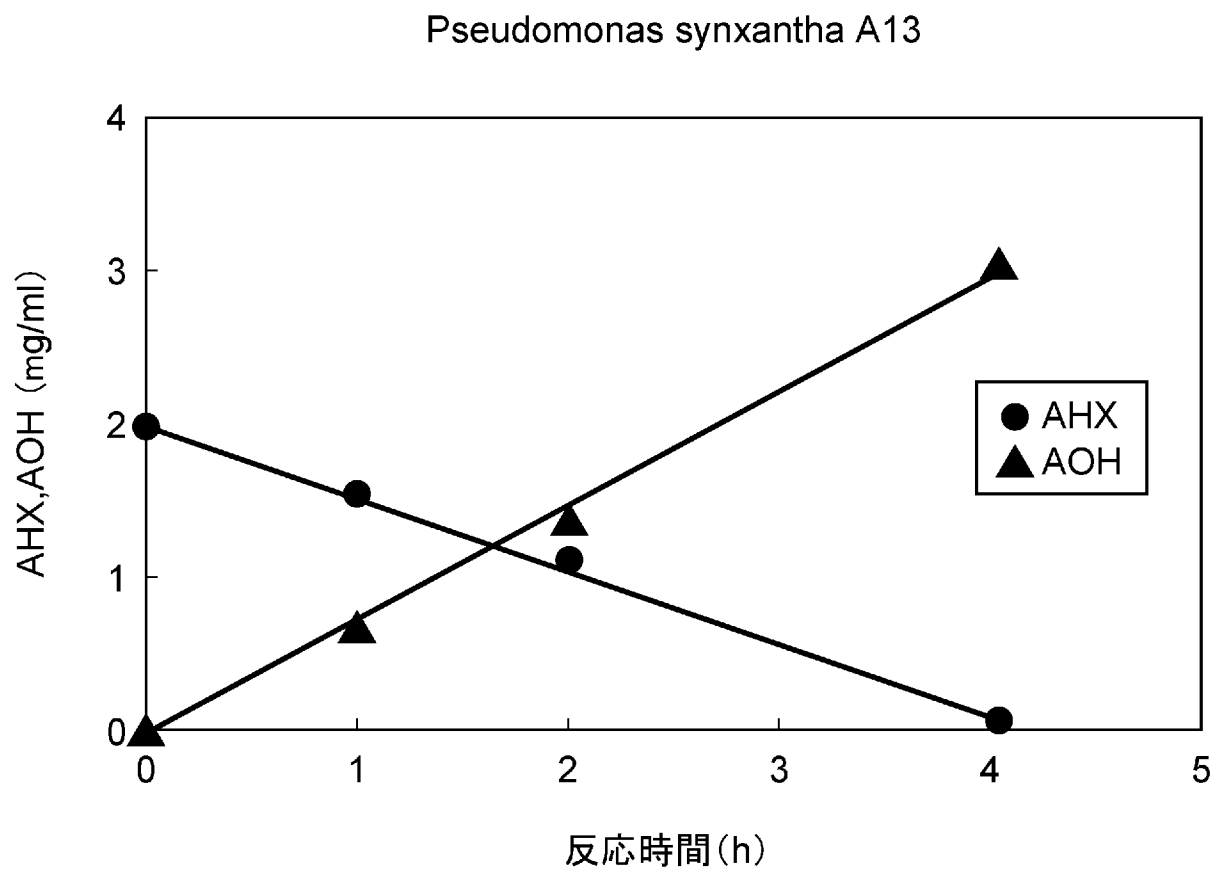
[図6]



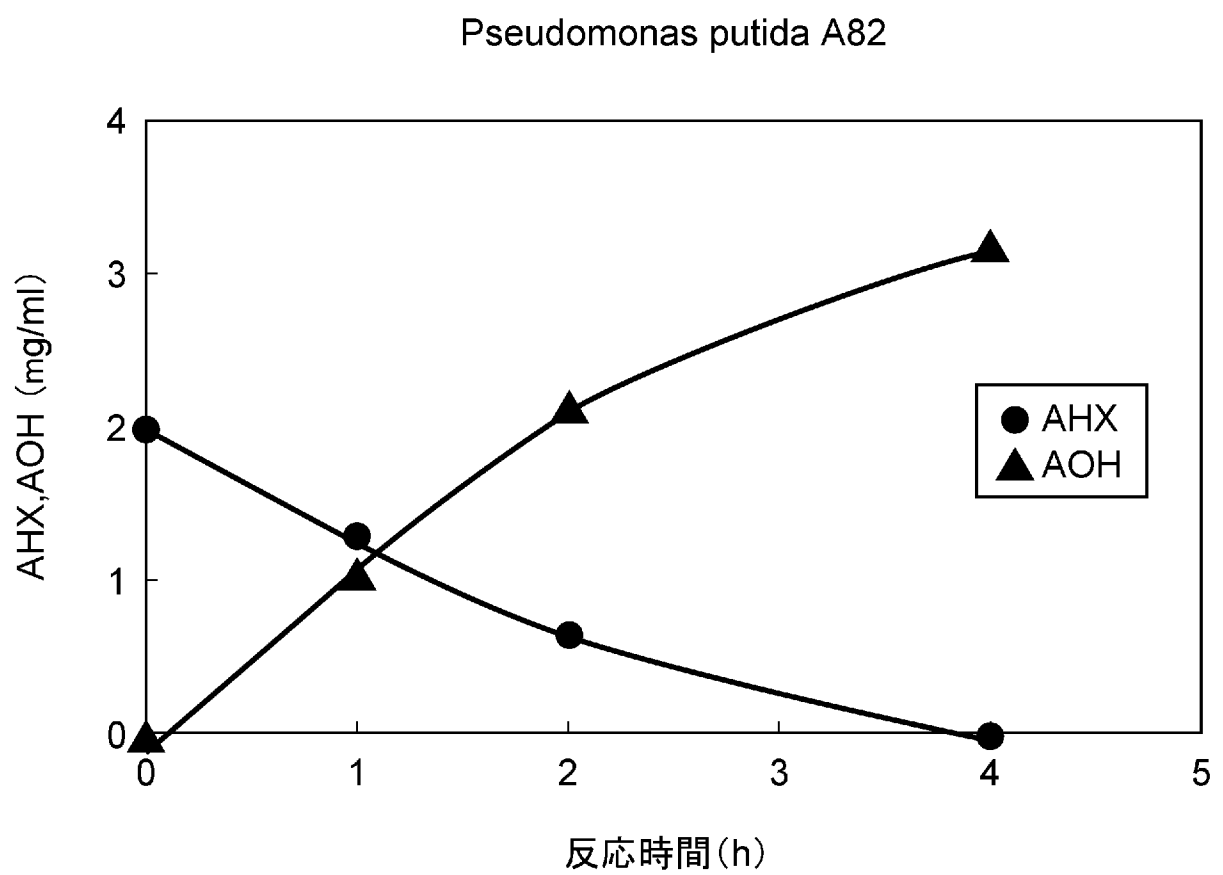
[図7]



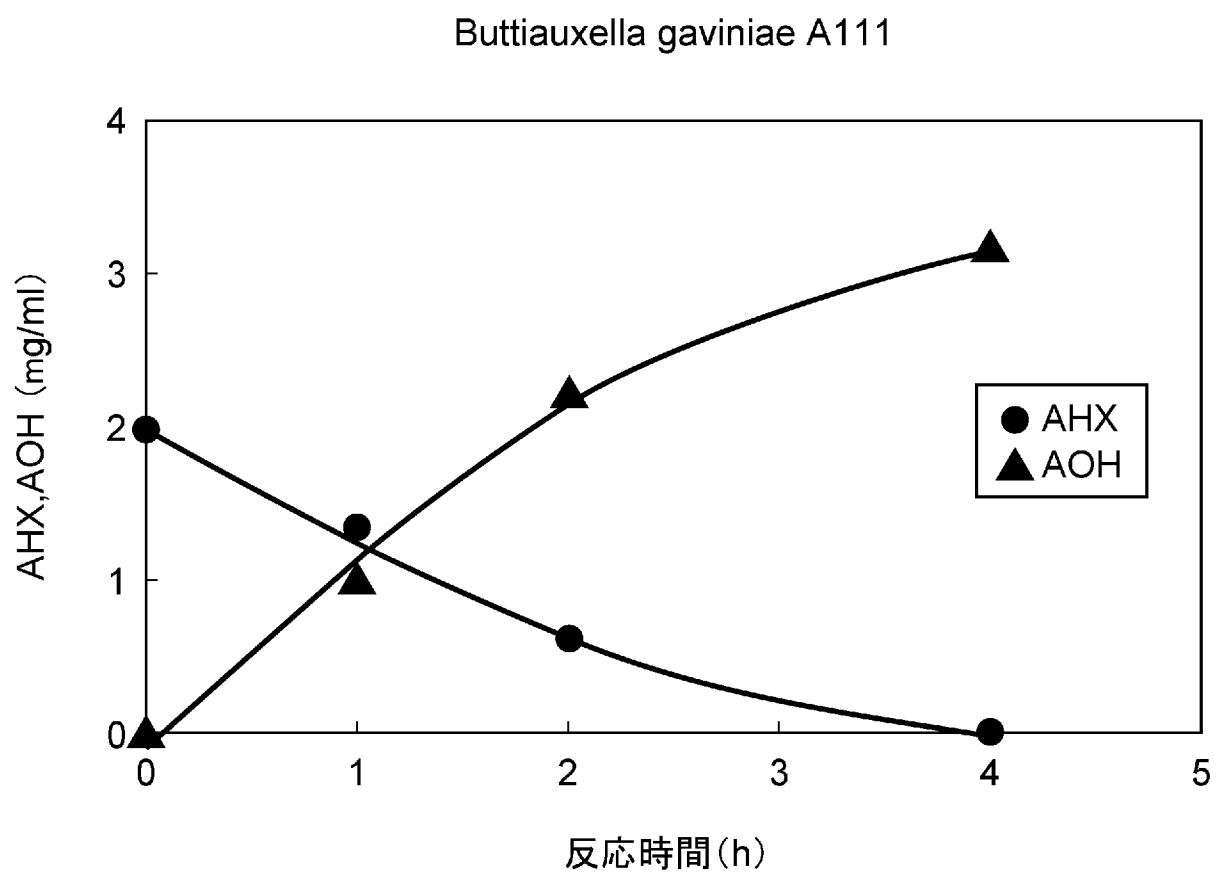
[図8]



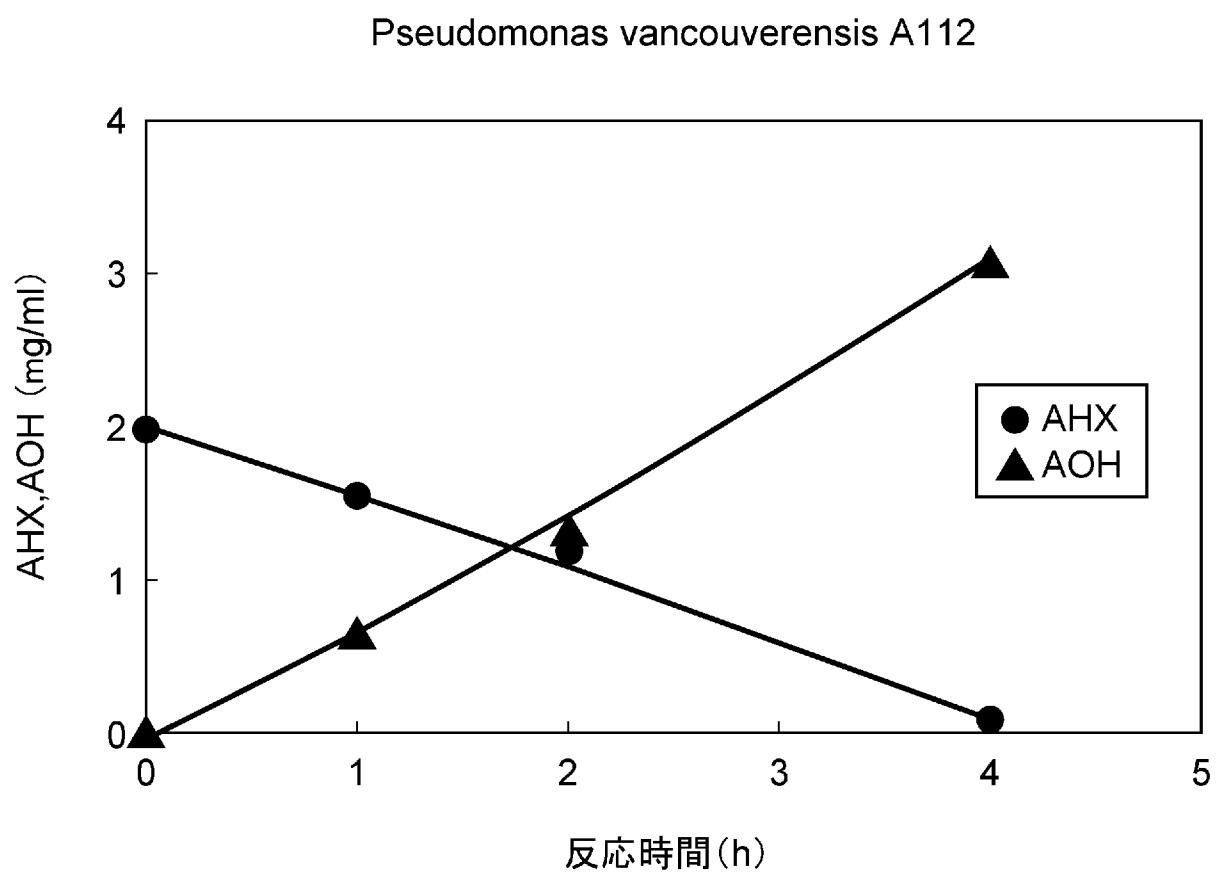
[図9]



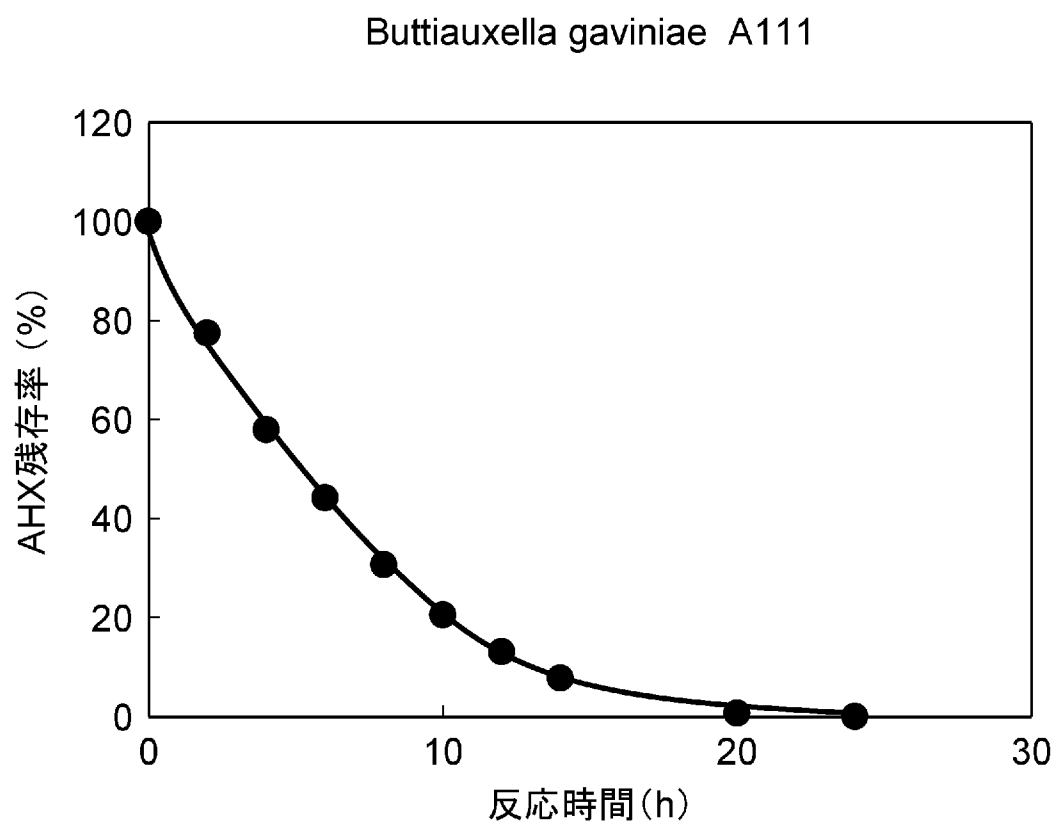
[図10]



[図11]



[図12]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054182

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P17/18(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n, C12R1/07(2006.01)n, C12R1/19(2006.01)n, C12R1/38(2006.01)n, C12R1/40(2006.01)n, C12R1/66(2006.01)n, C12R1/72(2006.01)n, C12R1/85(2006.01)n, C12R1/885(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P17/18, C12R1/01, C12R1/07, C12R1/19, C12R1/38, C12R1/40, C12R1/66, C12R1/72, C12R1/85, C12R1/885

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2016 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2016 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2016 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WO 2012/147750 A1 (National University Corporation Shizuoka University),<br>01 November 2012 (01.11.2012),<br>paragraphs [0005], [0007] to [0008], [0015] to [0019]; examples 1 to 5<br>& US 8809328 B2<br>column 1, line 57 to column 2, line 3; column 2, lines 10 to 19; column 3, line 12 to column 4, line 11; examples 1 to 5 | 1-3                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 April 2016 (07.04.16)

Date of mailing of the international search report  
19 April 2016 (19.04.16)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054182

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | CHOI J.H. et al., The Source of "Fairy Rings": 2-Azahypoxanthine and its Metabolite Found in a Novel Purine Metabolic Pathway in Plants, Angew. Chem. Int. Ed., 2014, Vol.53, pp.1552-1555, abstract, page 1553, left column, lines 7 to 8, page 1553, right column, line 27 to page 1554, right column, line 3, page 1553, left column, lines 10 to 11, fig. 1 | 1-3                   |
| Y         | IKEUCHI K. et al., Practical Synthesis of Natural Plant-Growth Regulator 2-Azahypoxanthine, its Derivatives, and Biotin-Labeled Probes, Org. Biomol. Chem., 2014, Vol.12, pp.3813-3815, page 3813, left column, lines 14 to 18, page 3814, left column, lines 5 to 7                                                                                            | 1-3                   |
| Y         | WOOLFOLK C.A. et al., Distribution of Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase Specificity Types Among Bacteria, J. Bacteriol., 1977, Vol.130, No.3, pp.1175-1191, page 1175, left column, lines 1 to 21, page 1176, right column, lines 6 to 20, page 1176, right column, lines 51 to 65, table 1                                                           | 1-3                   |
| Y         | JP 2011-103899 A (Ajinomoto Co., Inc.), 02 June 2011 (02.06.2011), paragraph [0014] & US 2005/0170474 A1 paragraph [0013]                                                                                                                                                                                                                                       | 1-3                   |
| Y         | JP 2010-527579 A (L'Air Liquide, Societe Anonyme pour L'Etude et L'Exploitation des Procedes Georges Claude), 19 August 2010 (19.08.2010), paragraphs [0009], [0021] & WO 2008/032186 A2 page 3, line 23 to page 4, line 6; page 8, line 28 to page 9, line 2                                                                                                   | 1-3                   |
| Y         | WO 2012/105495 A1 (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 09 August 2012 (09.08.2012), paragraphs [0141] to [0148] & US 9187771 B2 column 22, line 34 to column 23, line 25                                                                                                                                                                                              | 1-3                   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P17/18(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n, C12R1/07(2006.01)n, C12R1/19(2006.01)n, C12R1/38(2006.01)n, C12R1/40(2006.01)n, C12R1/66(2006.01)n, C12R1/72(2006.01)n, C12R1/85(2006.01)n, C12R1/885(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P17/18, C12R1/01, C12R1/07, C12R1/19, C12R1/38, C12R1/40, C12R1/66, C12R1/72, C12R1/85, C12R1/885

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                              | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | WO 2012/147750 A1 (国立大学法人静岡大学) 2012.11.01, 段落<br>[0005], 段落[0007]-[0008], 段落[0015]-[0019], 実施例 1-5<br>& US 8809328 B2, 第1欄第57行-第2欄第3行, 第2欄第10-19行,<br>第3欄第12行-第4欄第11行, 実施例 1-5 | 1-3            |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- |                                                                |                                                                     |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                     |

国際調査を完了した日

07.04.2016

国際調査報告の発送日

19.04.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 英雄

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

5804

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                              |                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                            | 関連する<br>請求項の番号 |
| Y                     | CHOI J.H. et al., The Source of "Fairy Rings": 2-Azahypoxanthine and its Metabolite Found in a Novel Purine Metabolic Pathway in Plants, Angew. Chem. Int. Ed., 2014, Vol.53, pp.1552-1555, 要約, 第1553頁左欄第7-8行, 第1553頁右欄第27行-第1554頁右欄第3行, 第1553頁左欄第10-11行, 図1 | 1-3            |
| Y                     | IKEUCHI K. et al., Practical Synthesis of Natural Plant-Growth Regulator 2-Azahypoxanthine, its Derivatives, and Biotin-Labeled Probes, Org. Biomol. Chem., 2014, Vol.12, pp.3813-3815, 第3813頁左欄第14-18行, 第3814頁左欄第5-7行                                       | 1-3            |
| Y                     | WOOLFOLK C.A. et al., Distribution of Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase Specificity Types Among Bacteria, J. Bacteriol., 1977, Vol.130, No.3, pp.1175-1191, 第1175頁左欄第1-21行, 第1176頁右欄第6-20行, 第1176頁右欄第51-65行, 表1                                    | 1-3            |
| Y                     | JP 2011-103899 A (味の素株式会社) 2011.06.02, 段落[0014] & US 2005/0170474 A1, 段落[0013]                                                                                                                                                                               | 1-3            |
| Y                     | JP 2010-527579 A (レール・リキードーソシエテ・アノニム・プー<br>ル・レテュード・エ・レクスプロワタシオン・デ・プロセデ・ジョ<br>ルジュ・クロード) 2010.08.19, 段落[0009], 段落[0021]<br>& WO 2008/032186 A2, 第3頁第23行-第4頁第6行, 第8頁第28<br>行-第9頁第2行                                                                             | 1-3            |
| Y                     | WO 2012/105495 A1 (旭化成ケミカルズ株式会社) 2012.08.09, 段落<br>[0141]-[0148]<br>& US 9187771 B2, 第22欄第34行-第23欄第25行                                                                                                                                                       | 1-3            |